

⑪ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 656 423**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **89 17069**

⑬ Int Cl⁵ : G 01 N 27/327, 27/48, 33/573; C 12 N 11/08, 9/08

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 22.12.89.

⑬ Priorité :

⑭ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 28.06.91 Bulletin 91/26.

⑮ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑯ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑰ Demandeur(s) : RHONE-POULENC CHIMIE — FR.

⑱ Inventeur(s) : Bardeletti Gilbert et d'Urso Edith.

⑲ Titulaire(s) :

⑳ Mandataire : Vignally Noël Rhône Poulenc Chimie
Service Brevets Chimie.

㉑ Biocapteur électrochimique.

㉒ Biocapteur électrochimique constitué d'une électrode
monocorps comprenant une anode et une cathode; un em-
bout muni d'une perforation centrale et d'une membrane
neutre permettant la diffusion du substrat se fixe à l'extré-
mité du capteur; le biocapteur renferme dans l'espace dis-
ponible entre l'embout et le corps de l'électrode et avoi-
sant l'électrode de travail des enzymes immobilisés sur
des particules de polymère non soluble dans le milieu réac-
tionnel.

Utilisation pour le dosage de substrats organiques libé-
rant par réaction enzymatique de l'eau oxygénée.

FR 2 656 423 - A1

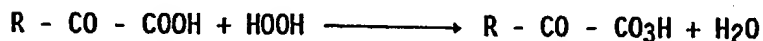
BEST AVAILABLE COPY



BIOCAPTEUR ELECTROCHIMIQUE

5 La présente invention a pour objet un biocapteur constitué d'une électrode enzymatique et son application pour le dosage de substrats organiques. Il est connu de doser le glucose par exemple à l'aide d'un capteur ampérométrique à H_2O_2 plongé dans une cuve dans laquelle est réalisée l'oxydation enzymatique du glucose en acide gluconique avec libération de H_2O_2 ; la quantité de H_2O_2 formée est directement proportionnelle à la
10 quantité de glucose mise en oeuvre. L' H_2O_2 est détectée ampérométriquement : une différence de potentiel (ddp) fixe, d'environ 600 mV, entre une électrode de travail (platine) et une électrode de référence (Ag/AgCl) permet l'oxydation électrochimique de H_2O_2 sur l'anode de platine ; une
15 variation de courant anodique proportionnelle à la concentration d' H_2O_2 formée par la réaction enzymatique peut être ainsi mise en évidence sur un enregistreur. Une telle méthode faisant intervenir un enzyme relativement peu fragile comme la glucose oxydase est particulièrement performante. Par contre celle-ci est mal adaptée aux dosages faisant intervenir des
20 enzymes fragiles entraînant des phénomènes d'inactivation ou d'interaction entre substrat et produit de la réaction enzymatique. Il en est ainsi du dosage du pyruvate à l'aide de la pyruvate oxydase. En effet il a été constaté que le substrat (pyruvate) et l'eau oxygénée formée interagissent avec formation d'un peracide.

25



30

Si la pyruvate oxydase est introduite dans la cuve de mesure, l'eau oxygénée formée réagit rapidement avec le pyruvate ; il en résulte une diminution de la concentration des deux espèces dans la cuve ; le dosage est alors inexact.

La demanderesse a résolu ce problème en introduisant les enzymes à l'intérieur du capteur électrochimique.

Selon l'invention il s'agit d'un biocapteur électrochimique constitué d'une électrode monocorps comprenant une anode et une cathode, et se fixant à l'extrémité du capteur, d'un embout muni d'une perforation centrale et d'une membrane neutre permettant la diffusion du substrat, biocapteur caractérisé en ce qu'il renferme dans l'espace disponible entre l'embout et le corps de l'électrode et avoisinant l'"électrode de travail" des enzymes immobilisés sur des particules de polymère non soluble dans le milieu réactionnel.

Le biocapteur de l'invention basé sur une détection ampérométrique est tout particulièrement intéressant pour le dosage de substrats organiques libérant par réaction enzymatique de l'eau oxygénée. L'"électrode de travail", l'anode, est constituée d'un disque de platine où se réalise la réaction électrochimique.

L'électrode de référence, la cathode, est constituée d'un fil spiralé d'argent recouvert de chlorure d'argent.


Un électrolyte présent dans l'espace entre l'embout et le corps de l'électrode assure la conductivité entre l'anode et la cathode ; la présence de chlorure de potassium dans l'électrolyte assure la chloruration permanente de l'électrode de référence.

Le corps et l'embout de l'électrode sont de préférence en résine synthétique du type polychlorure de vinyle.

La membrane est neutre ; elle peut être constituée en fibres synthétiques (polyester, polyamide...) ; son épaisseur est généralement de l'ordre de 50 à 150 micromètres avec un diamètre de pores inférieur à celui des particules de polymère et généralement de l'ordre de 0,1 à 0,8 micromètres. Les polymères pouvant constituer les particules support dérivent de monomères non miscibles à l'eau (c'est-à-dire de solubilité dans l'eau inférieure à 5 % en poids).

Parmi ces monomères on peut citer :

- 30 - les monomères vinylaromatiques (styrène, vinyltoluène...)
- les alkylesters d'acides α - β insaturés (acrylates et méthacrylates de méthyle, éthyle...)
- les esters d'acides carboxyliques insaturés (acetate de vinyle...)
- le chlorure de vinyle ; le chlorure de vinylidène
- 35 - les diènes (butadiène...)
- ceux présentant des fonctions nitriles (acrylonitrile...)
- les siloxanes.

5 - SO₃H, - OSO₃H, - $\overset{+}{N}R_3$, - COOH, - OH, - NH₂, - NR₂, - $\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \quad \text{O} \end{array}$, - ϕ CH₂Cl, -
CONH₂, - SH, - N, - COOR, - PO(OR)₂,

10

15

20

25

30

35

- des oxydes de fer : Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pur ou en combinaison ou en mélange avec d'autres oxydes comme les oxydes de cobalt, manganèse, zinc, baryum, terres rares ;

- du dioxyde de chrome.

5 Les particules de polymère magnétisable peuvent être obtenues sous forme de latex selon des procédés connus par exemple selon les procédés décrits dans le brevet européen n° 38.730 ou le brevet américain n° 4.157.323.

L'immobilisation des enzymes sur les particules de polymère magnétisable ou non magnétisable peut être réalisée par adsorption ou bien par couplage, la
10 réaction de couplage faisant intervenir les groupes superficiels réactifs ou fonctionnels du polymère et les groupements fonctionnels de l'enzyme à fixer.

La réaction de couplage peut être réalisée selon des méthodes bien connues par exemple en faisant appel le plus souvent à l'activation des fonctions
15 du polymère en utilisant des agents de couplage (diazotation, bromure de cyanogène, chlorure de tosyloxy, glutaraldehyde, carbodiimide hydrosoluble, N-hydroxybenzotriazole...) avec ou sans l'utilisation de spacers du type 1-6 diaminohexane, polysaccharide..., puis réaction avec l'enzyme à fixer. Des exemples de réactions de couplage sont donnés dans les brevets
20 américains n° 3.857.931, 4.045.384, 4.140.662, 4.046.723, 4.421.896, anglais n° 2.004.892, français n° 2.331.567, 2.345.459, 2.378.094, européen n° 15.841...

Le protocole d'immobilisation doit être adapté en fonction des caractéristiques propres de l'enzyme utilisé (pH optimum, activité
25 spécifique...)

La quantité d'enzyme immobilisée sur les particules de polymère est généralement de l'ordre de 10 à 500 unités d'enzyme par gramme de polymère (de préférence de 100 à 200).

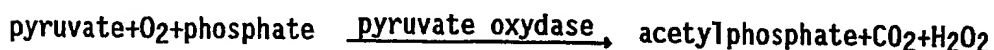
Le biocapteur faisant l'objet de l'invention étant particulièrement
30 intéressant pour les dosages de substrats organiques libérant par réaction enzymatique de l'eau oxygénée, les enzymes mis en oeuvre sont en particulier les oxydases comme par exemple :

- la lactate oxydase pour doser le L-lactate
- la glucose oxydase pour doser le glucose
- 35 - la pyruvate oxydase pour doser le pyruvate
- l'alcool oxydase pour doser les alcools courts (methanol, ethanol, propanol...)

- ...

Lors de son utilisation, le biocapteur relié à un polarostat imposant une différence de potentiel entre l'anode et la cathode, est plongé dans une cuve thermostatée (généralement vers 30°) contenant le substrat à doser. Les enzymes immobilisés à l'intérieur du biocapteur ne pouvant diffuser à l'extérieur de l'électrode, l'eau oxygénée se forme au voisinage de l'anode.

Dans le cas du pyruvate le schéma réactionnel est le suivant :

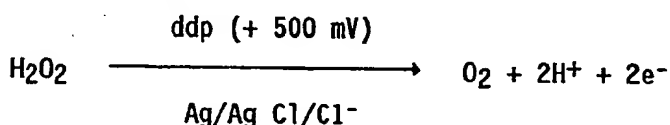


10

La quantité de H₂O₂ formée est directement proportionnelle à celle du pyruvate présent.

L'eau oxygénée, au fur et à mesure de sa formation, est oxydée à l'anode selon la réaction

15



20

Un enregistreur relié au polarostat permet de lire la variation du courant en fonction du temps.

25

La même opération réalisée avec un biocapteur classique (ne renfermant pas l'enzyme immobilisé) plongé dans une cuve contenant du pyruvate et de la pyruvate oxydase immobilisée sur des particules de polymère ne peut conduire à un dosage satisfaisant du substrat car ce dernier interagit sur l'eau oxygénée formée.

La mise en oeuvre de ce biocapteur est aisée et rapide ; celui-ci peut être réutilisé.

REVENDICATIONS

- 5 1) Biocapteur électrochimique constitué d'une électrode monocorps comprenant une anode, une cathode, et se fixant à l'extrémité du capteur, d'un embout muni d'une perforation centrale et d'une membrane neutre permettant la diffusion du substrat, biocapteur caractérisé en ce qu'il renferme dans l'espace disponible entre l'embout et le corps de l'électrode et avoisinant l'électrode de travail des enzymes immobilisés sur des particules de polymère non soluble dans le milieu réactionnel.
- 10 2) Biocapteur selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'électrode de travail est l'anode et en ce qu'elle est constituée d'un disque de platine.
- 15 3) Biocapteur selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'électrode de référence est la cathode et en ce qu'elle est constituée d'un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent.
- 20 4) Biocapteur selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les particules de polymère sur lesquelles sont immobilisés les enzymes dérivent d'une composition monomère non miscible à l'eau contenant jusqu'à 10 % de son poids d'au moins un monomère portant des groupes ionogènes ou réactifs.
- 25 5) Biocapteur selon la revendication 4 caractérisé en ce que les particules de polymère ont une granulométrie de l'ordre de 0,2 à 20 microns.
- 30 6) Biocapteur selon la revendication 5 caractérisé en ce que les particules de polymère contiennent de 0,5 à 70 % de leur poids d'une charge magnétisable.
- 35 7) Biocapteur selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la quantité d'enzyme immobilisée sur les particules de polymère est de l'ordre de 10 à 500 unités d'enzyme par gramme de polymère.
- 8) Utilisation du biocapteur faisant l'objet de l'une quelconque des revendications précédentes pour le dosage de substrats organiques libérant par réaction enzymatique de l'eau oxygénée.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2656423

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 8917069
FA 435872

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	ANALYTICA CHIMICA ACTA vol. 213, 1988, AMSTERDAM NL pages 121 - 130; A.Miyabayashi et al.: "An enzyme electrode based on electromagnetic entrapment of the biocatalyst bound to magnetic beads" * le document en entier *	1-8
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 19, 09 mai 1983 Columbus, Ohio, USA KURARAY Ltd.: "Polymer-coated supports for use as selective adsorbents, selective electrodes, or column chromatography stationary phases" &JP-A-57150433 page 232; colonne 2; ref. no. 157436T * abrégé *	1-3
A	JEE JOURNAL OF ELECTRONIC ENGINEERING. vol. 23, no. 233, mai 1986, TOKYO JP pages 80 - 87; N.Ichinose: "Biosensors: today and tomorrow" * le document en entier *	1-3, 8
A	J.G.Schindler et al.: "Bioelektrochemische Membranelektroden" 1983, WALTER DE GRUYTER, BERLIN * pages 220 - 224 *	1, 4, 7, 8
A	ASAI0 TRANSACTIONS. vol. 32, no. 1, juillet 1986, HAGERSTOWN, MD US pages 148 - 150; D.A.GOUGH ET AL.: "Short-term in vivo operation of a glucose sensor" * page 149; figure 1 *	1
A	EP-A-1223 (F.HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) * le document en entier *	1, 4
D	& GB-A-2004892	
Date d'achèvement de la recherche 23 AOUT 1990		Examinateur DE KOK A.J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

BEST AVAILABLE COPY